

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-504784

(43) 公表日 平成8年(1996)5月21日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

A 6 1 K 38/00

47/18

47/26

J 7433-4C

J 7433-4C

9455-4C

A 6 1 K 37/02

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願平6-514766  
(86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月15日  
(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)6月19日  
(86) 国際出願番号 PCT/EP93/03543  
(87) 国際公開番号 WO94/14465  
(87) 国際公開日 平成6年(1994)7月7日  
(31) 優先権主張番号 P4242863.7  
(32) 優先日 1992年12月18日  
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, BG, BR, CA, C Z, FI, HU, JP, KR, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, UA, US

(71) 出願人 ベーリンガー マンハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング  
ドイツ連邦共和国, デー—68298 マンハイム, サンドホーフエル シュトラーセ 116  
(72) 発明者 ミカエリス, ウベ  
ドイツ連邦共和国, デー—82362 バイルハイム, プエトリーヒシュトラーセ 25  
(72) 発明者 ルドルフ, ライナー  
ドイツ連邦共和国, デー—82362 バイルハイム, ファエルベルガッセ 17  
(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G-CSFの安定凍結乾燥薬理製剤

(57) 【要約】

本発明は、安定剤としてマルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖を含むG-CSFの凍結乾燥薬理製剤に関する。更に、本発明はこのような安定化凍結乾燥品の製造のための方法、及びG-CSFを含む薬剤の安定剤としてのマルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖の利用に関する。

**【特許請求の範囲】**

1. マルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖を含むG-CSFの凍結乾燥薬理製剤。
2. 使用しているG-CSFの量より少ない又は最大でそれと同量である生理学的に寛容される量の界面活性剤を更に含む、請求項1記載の凍結乾燥製剤。
3. 0.5mg/ml、好ましくは0.01~0.1mg/mlの界面活性剤を含む、請求項2記載の凍結乾燥製剤。
4. 生理学的に寛容される量のアミノ酸を更に含む、請求項1~3のいずれか1項記載の凍結乾燥製剤。
5. アルギニン及び／又はフェニルアラニンを含む、請求項4記載の凍結乾燥製剤。
6. 酸化防止剤、錯生成剤、緩衝剤、酸、塩基又は等張性剤の群から選ばれる生理学的に寛容される助剤を含む、請求項1~5のいずれか1項記載の凍結乾燥製剤。
7. リン酸又は酢酸緩衝剤を含む、請求項1~6のいずれか1項記載の凍結乾燥製剤。
8. リン酸アルギニン、塩化アルギニン又はクエン酸アルギニン緩衝剤を、好ましくは7~8のpH値において含む、請求項1~6のいずれか1項記載の凍結乾燥製剤。
9. タンパク質様助剤又はポリマー助剤を本質的に含まない、請求項1~8のいずれか1項記載の凍結乾燥製剤。
10. 請求項1~9のいずれか1項記載の凍結乾燥製剤の再溶解により得られる水溶薬理製剤。
11. 前記溶液が6.5~8又は3~5のpH値、好ましくは7.0~7.5のpH値を有する、請求項10記載の水性薬理製剤。
12. 請求項1~9のいずれか1項記載の凍結薬理製剤の製造のための方法であって、活性成分としてのG-CSFと、助剤としてのマルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖、並びに任意的に、更なる薬理助剤を含む

水性調製品を調製し、次いでその溶液を凍結乾燥する、方法。

13. 活性物質としてG-CSFを含む安定な凍結乾燥薬理製剤の製造のためのマルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖の利用。

**【発明の詳細な説明】****G-CSFの安定凍結乾燥薬理製剤**

本発明は、安定剤としてマルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖を含むG-CSFの凍結乾燥薬理製剤に関する。更に、本発明はこのような安定化凍結乾燥品の製造のための方法、及びG-CSFを含む薬剤の安定剤としてのマルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖の利用に関する。

G-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）を含む様々な薬理製剤が既に当業界で知られている。

G-CSFを含む薬剤はDE 37 23 781（GB 2,193,631号）に記載されており、これは少なくとも一の薬理学的に許容される界面活性剤、サッカライド、タンパク質又は高分子化合物をG-CSFの安定化のために含む。安定化剤としてヒト血清アルブミンを含む製剤が提案されている。特に、使用するG-CSFの量の1～1000倍に相当する重量部において界面活性剤を含む製剤が有利であると記載されている。

G-CSFの安定化製剤はEP 0,373,679号に記載され、これは酸性の溶液pH値を特徴とし、可能な限り低い導電率を有する。この溶液が例えば緩衝剤又はマンニトールの如くの薬理助剤を更に含む場合、その溶液は3～3.7のpH値を有する。もし緩衝剤がその薬理配合物の中に存在しているなら、2.75～4のpH域が有利であると述べられている。

ヒトタンパク質製剤の安定化凍結乾燥品がEP 0,306,824号に記載されており、その安定化は尿素、アミノ酸及び清浄剤の混合物の添加により達せられている。

先のPCT特許出願PCT/EP92/01823号において、点滴及び注射

を目的とするG-CSFを含む寛容性のよい薬剤の製造プロセスが述べられている。液体投与形態は特に低滴定酸性度及び低緩衝能を特徴とする。G-CSFを含む記載の点滴及び注射溶液のpH値は3.8～4.5の酸性域にある。

防腐剤を更に含むG-CSF含有液状形態薬理剤の製造プロセスがPCT/EP92/01822より公知にされている。薬理溶液のpH値は2.5～4.5の酸性域にある。この場合、G-CSFの安定化は、G-CSFにとって好適な酸性pH値を設定することにより、及び

様々なアミノ酸の混合物の添加により本質的に達せられる。

ところで、G-CSFに関する従来公知の薬剤投与形態はいくつかの欠点を有する。液状G-CSF製剤はあるケースにおいては凍結融解に対して敏感でありうる。かかる製剤の無秩序な凍結融解は二量体、オリゴマー、及び凝集体の形成を招きうる。不溶性沈殿物も生じうる。タンパク質を含む薬剤のかかる特性は医薬学の見地から問題であり、その理由は薬理溶液の突発的な凍結、それ故品質的に変化した製剤の投与の危険性を完全に回避するのが不可能なためである。

更に、DE 37 23 781号に記載の製剤の欠点は、それが薬理添加剤又は助剤を含むが、それらは医学の見地から、無害と単純に判定することができないという点にある。ポリマー及びタンパク質はその起源及びその生理化学的特性に基づき、薬理添加剤としてのその適正について一定の残留的な危険性を有している。ヒト又は動物起源のタンパク質及び細胞培養物より獲得したタンパク質はウィルス汚染の潜在的な残留的危険性を抱えている。分析学上検出困難な他のタンパク質様不純物はその抗原特性に基づきヒトにおいて免疫反応をも引き起こす。更に、動物起源のタンパク質は一般にその種-特異性特性に基づきヒトにおける免疫反応を誘引しうる。かかるタンパク質の後の再投与後の長期反応も考えられる。

高分子量化合物の添加も問題となりうる。ポリマーはその高分子量に原因して体内に蓄積することがあり、そしてそれ故生分解が生じないとしたら体内に長期間残留し続けうる。これは皮下投与の場合に特に危険であり、なぜならその血液を介する排除及び分散が静脈投与に比べてはるかに遅いからである。ポリマーはその分子量に依存して抗原特性も有しうる。更に、ポリマーの純度は保障することが難しく、その理由はその製造に用いた触媒又はモノマー及びその他のポリマーフラグメントの存在にある。液状投与薬理形態におけるポリマーの使用は従って、皮下投与できる薬理剤の形態の場合に特に、可能ならば避けるべきである。

DE 37 23 781号に記載の界面活性剤の量も医学的な見地から問題であると考えべきである。それにおいては界面活性剤の濃度は、G-CSFの重量に比例して1、対10000重量部の界面活性剤で存在していることが有利であると記載されている。一方、もし臨床的使用にわたるG-CSFの好適な適用濃度が最終薬理配合物

において0.05~1.5mg/mlであると考えらるなら、このことは対応の高界面活性剤濃度をもたらしてしまう。このことは医学的見地から避けるべきであり、なぜならそれらは局部刺激を引き起こしうるからである。

上記の配合物の欠点は、特に皮下投与の場合に、それらが、使用する低pH値に基づき、患者において局部的な不耐を招いてしまうことにある。得られる製品は敏感な患者において痛み及び局部組織刺激を引き起こしてしまうことがあり、なぜなら組織において存在している7.0~7.5の生理学的pH域はそれに適合しないからである。

更に、特にG-CSFの非グリコシル化形態はCHO細胞から獲得したグリコシル化G-CSFに比べて極めて不安定であることが文献から公知となっている (J. Biol. Chem. 1990, 265, 11432)。G-CSFの非グリコシル化形態の安定化は従って極めて困難であり、そしてこの分

子を安定な薬剤の中に配合するためには特別に選ばれた手段を必要とする。

本発明の目的は、薬剤としてのG-CSFの適切な利用を可能にし、且つ上記の従来公知の薬剤形態の欠点を有さないG-CSFの薬剤投与形態を提供することにある。この薬理製剤は無秩序な凍結融解過程に対して安定であり、更に凍結乾燥品として長期間保存したときに安定であり、生理学的によく寛容され、使用が簡単であり、そして正確に投与可能であるべきである。

DE 37 23 781号に記載の実施例は、助剤としてヒト血清アルブミンを使用したときに安定な凍結乾燥品が得られることを示す。糖アルコールのみの添加はあまり安定でない配合物をもたらす。従って、従来技術を改善する観点で、ヒト血清アルブミン(HSA)又はその他のタンパク質もしくはポリマーを含まないが、にもかかわらず高温において良好な安定性を有する配合物を見い出すことが所望される。ヒト血清アルブミン及びポリマーの無さはHSAの如くに記載のような副作用の医学的危険性を低める。

驚くべきことに、本発明の概念において、マルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖を添加剤として使用したときに安定な薬剤形態を作ることが可能となることを見い出された。

マルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖を含む固形製剤は、タンパク質の品質の有意義な低下を伴うことなく、凍結しても高温（40℃まで）で保存してさえもよい。活性物質の薬理学的品質はこれにより悪影響を受けない。本発明に係る製剤の好ましくは凍結乾燥品として市場に置かれる。再溶解後に調製された水性製剤は非常によく寛容され、そしてタンパク質の安定性に関して非常に高品質である製剤を供する。更に、助剤としての

マルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖の添加は、4～5又は7～8の好適なpH値で溶液が調製されることができるという長所をそれらは有しており、他方、当業界公知の溶液はタンパク質を安定化するために2.5～3.5のpH値を有する溶液を一般に必要とする。

本発明に係る製剤の追加の利点は、それらが、医学の見地から問題となりうるタンパク質様又はポリマー助剤を含まないことにある。凍結乾燥品を溶解することにより得られるG-CSFを含む液状薬剤投与形態は約4～5又は7～8のpH値で、好ましくは血液のpH値（pH 7.2～7.4）に近いpH値で製造できるようになったため、それらは寛容され、且つ痛みを実質的に伴ずに投与可能である利点も有する。このことは皮下投与にとって特に重要であり、なぜならこの場合の方が静脈投与よりも不耐が生じ易いからである。本発明に係る製剤は0.05～1.5mg/mlの臨床学的に極めて好適な濃度域においても調製でき、従って注射容量を $\leq 1.0$ mlに保つことが可能である。少量の注射容量は皮下投与にとって極めて好都合であり、なぜならそれらは皮下組織においてほんのわずかな機械的刺激しか及ぼさないからである。

更なる利点は、助剤の選択により、液状薬理製剤において従来必要とされてきた比較的大量の界面活性剤がもはや必要でないことにある。対照的に、0.5mg/ml未満、好ましくは0.01～0.1mg/mlの低い界面活性剤の量がG-CSFを安定化するのに適当である。単位容量当りに使用するG-CSFタンパク質の量より低い又は最大でそれと同じの界面活性剤の濃度（mg/ml）を好適に利用できる。このことはG-CSFの皮下投与を意図する液状薬剤形態にとって極めて好都合である。更に、本発明に係る手段は特に不安定な非グリコシル化G-CSF分子の薬理製剤の適切な

安定化を招く。

助剤マルトース（麦芽糖、マルトビオース、4-O-アルファ-D-グルコピラノシル-D-グルコース）は活性物質G-CSFの量の0.01~10000倍の量で使用する。このことは助剤、ラフィノース、スクロース及びトレハロースにも適用される。これらの助剤の液状薬剤形態中での濃度は0.1~200mg/ml、好ましくは10~60mg/mlである。立体異性二糖類セロビオース、ゲンチオビオース又はイソマルトースもマルトースの代わりに使用できうる。アミノ糖は一般に、ヒドロキシの代わりにアミノ基又はアシル化アミノ基を有する単糖類をいう。これらの例はグルコサミン、ガラクトサミン及びノイラミニン酸である。

特定の態様において、マルトース、ラフィノース、スクロース又はトレハロースに加えてアミノ酸を含む薬理製剤を提供する。塩基性アミノ酸、例えばアルギニン、リジン、オルニチン等、酸性アミノ酸、例えばグルタミン酸、アスパラギン酸、そして更には芳香族アミノ酸、例えばフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン等が特に考慮に入れられる。

アミノ酸は活性物質G-CSFの量の0.01~10000倍で使用する。液状薬理製剤中のこれらの助剤の濃度は0.1~200mg/ml、好ましくは1~50mg/mlである。

凍結乾燥品を作るには、まずは活性物質及びその他の一般的な薬理助剤を含む水性薬理溶液を調製する。アミノ酸、例えばアルギニン、リジン、オルニチン、フェニルアラニン又はチロシンが薬理助剤として特に考慮に入れられる。更に、この水性製剤は、一般の緩衝剤、例えば酢酸、クエン酸、乳酸、マレイン酸及びリン酸、又はその生理学的に寛容されている塩を含んでよい。この助剤溶液の製造において、これらの緩衝剤は対応の遊離酸の形態において、又はアルカリ、アルカリ土類もしくはアンモニウム塩の形態のいずれか

において存在しうる。この溶液は更に一般の薬理助剤を含みうる。

様々な助剤又は活性物質の添加の順序は、製造工程とは大いに独立しており、そして当業者の判断にある。溶液の所望のpHはアルカリ水酸化物、アルカリ土類水酸化物又は水酸化アンモニウムの如くの塩基を加えることにより調整される。



水酸化ナトリウムがこのために好適に利用される。所望のpH値の調整は塩基溶液の添加により主に達成されうる。一般に、強塩基と弱酸との塩、例えば酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウムもしくは二カリウム又は炭酸ナトリウムがこの目的のために考慮される。もし助剤の薬理溶液が塩基性のpH値を有すなら、それは所望のpH域が達せられるに至るまでの酸の滴定により調整される。生理学的に寛容される無機又は有機酸、例えば塩酸、リン酸、酢酸、クエン酸又は酸性のpH値を有する慣用の物質の溶液が考慮される。これに関して好適な物質は、強酸と弱塩基との塩、例えばリン酸二水素ナトリウム又はリン酸二水素カリウムである。

即時投与型液状薬剤形態中の緩衝剤の濃度は好ましくは各ケースにおいて約2~80mmol/lである。緩衝剤の総濃度は100mmol/lの値を越えるべきでない。緩衝剤の濃度は好ましくは5~40mmol/lである。

前記助剤によるG-CSF分子の安定化は組換プロセス及びその変法により作られる全てのG-CSF分子主に関係する。本発明に係る語G-CSF又はG-CSF変異体には、全ての天然G-CSF変異体及びそれに由来する組換DNA技術により修飾されたG-CSFタンパク質、特にG-CSF部に加えてその他のタンパク質配列を追加的に含む融合タンパク質が含まれる。これに関係して、原核細胞における発現にとって適当な-1位においてN-末端Met残基を有するG-CSFムテインが特に好適である。PCT/EP91/00192に従って作れる組換メチオニン

非含有G-CSF変異体が同等に適当である。「G-CSF変異体」なる語は、1又は数個のアミノ酸が欠失しているか、又は別のアミノ酸により置換されており、G-CSFの本質的な特性が実質的に維持されているG-CSF分子を含むものと解される。適当なG-CSFムテインは例えばEP 0,456,200号に記載されている。

活性物質及び安定化のために用いる助剤の浸透圧特性によっては等張性が前もって達成されていないなら、寛容性のよい非経口薬理製剤の製造のために等張的に働く助剤を加えることが期待される。この目的のため、非イオン型の寛容性のよい助剤が主として利用される。

等張性を調整するために塩を加えることは好適でなく、その理由は高濃度の塩

又はイオンはG-CSF凝集体の生成を促進するからである。従って、塩は少量で加えることが好都合である。

本薬理製剤は更なる慣用の助剤又は添加剤をも含みうる。酸化防止剤、例えばグルタチオン、アスコルビン酸又は類似の物質、カオトロピック助剤、例えば尿素、及びアミノ酸、例えばアルギニン、リジン、オルチニン等を加えてよい。

本発明を以下に代表的な実施態様例を基礎により詳しく説明する：

実施例1～14は、タンパク質の安定性に関して詳しく、どのようにして本発明に係る凍結乾燥品が配合、製造及び検査できるかを示している。マルトース、ラフィノース、スクロース又はトレハロースの他に加える助剤及びpH値の影響を明らかにする。

マンニトール又はグリシンを基礎として作った凍結乾燥品についての比較実験は、マルトース、ラフィノース、スクロース又はトレハロースが、他のビルダーで調製した製剤よりも有意に優れた結果をもたらすことを示した。本発明の係る記載の且つ実施例の中で明

らかにしている凍結乾燥品の利用は所望の目的のために作られる最適な配合を可能にし、それは生理学的に寛容されるpH値を有し、タンパク質に対するネガティブな作用を伴うことなく、高い貯蔵温度及び機械的ストレスに耐久性の長期保存安定性を有する。この製剤は特に凍結に対して敏感でなく、そしてタンパク質又はポリマーの如くの重要と考えられる助剤と完全に分配することが可能である。更に、それらは比較的少量の生理学的によく寛容される界面活性剤しか含まない。

実施例3においては、様々な糖又は糖アルコールを、G-CSF凍結乾燥品におけるその安定性作用について調べている。マルトースはラクトース及びマンニトールに比べて有利であると認められた。

マルトース及び更なる助剤を含む凍結乾燥品が実施例4に記載されている。その結果は、界面活性剤の添加は製剤の安定性に実質的な影響を及ぼさないが、表層に対するタンパク質の付着を妨げ、それ故容器における考えられる損失を妨げることを明確に示す。かかる配合物中の界面活性剤の存在は従って安定化の理由

にとっては必須でなく、むしろ正味の投与量を維持するのに必要である。

マルトースを含む様々な凍結乾燥製剤を実施例5において、マルトースを有さない以外は同じように配合した2種類の凍結乾燥品と比較した。このデータは、マルトースの存在は製剤の安定性に関して調べたパラメーターに有利な影響を及ぼすことを明確に示している。更なる助剤、例えばアスコルビン酸、グルタチオン又はグルタミン酸の添加は調べた貯蔵温度及び貯蔵期間の枠内においては安定性に対して有意義な影響を及ぼさなかった。実施例5に記載の製剤は、高温での長期貯蔵に基づく調べた品質基準においてそれらが変化を示さない事実によって特に区別される。

更に、マルトース及びアルギニンを含む凍結乾燥品においては更

なる緩衝剤は絶対的に必要でないことがこれらの実施例より明らかにされており、なぜならpHを塩酸、リン酸、クエン酸又はその他の酸で調整して形成したアルギニン緩衝剤は適度なpH安定性作用を有するからである。アルギニン緩衝剤は5.0以下及び7.0~7.5のpH域において安定な製剤を配合するのに極めて適切である(実施例11及び12参照のこと)。実施例9は、pH 7.4を有し、且つマルトース及びアルギニン緩衝剤を含む再溶解凍結乾燥品は少なくとも24時間安定であることを示す。

実施例6においては、アミノ糖(ガラクトサミン、N-メチルグルコサミン)を含むG-CSF凍結乾燥品を述べている。マルトースとアミノ糖との組合せは、グリシンとアミノ糖との組合せよりも安定な製剤をもたらすことがわかる。このことは、マルトースと生理学的によく寛容されている助剤との組合せは、論文の中に提唱されているその他のビルダー及び安定剤よりもかなり安定であり、そしてそれ故薬理学的品質に関してより高品質であるG-CSF凍結乾燥品をもたらすことを実証している。

実施例7は、マルトースを含む凍結乾燥品中のG-CSFが、マンニトールを含む凍結乾燥品中のそれよりも安定であることを示す。このことは関連の貯蔵温度及び長期貯蔵期間に従って実証される。

実施例8は、様々なpHでマルトースを含み、且つ様々な助剤添加剤を含む凍結

乾燥品が、その他のビルダー及び安定剤（糖アルコール、アミノ酸）を有する凍結乾燥品に比べて有利な結果をもたらすことを示している。

実施例10は、マルトース、ラフィノース、スクロース又はトレハロースを含む本発明の凍結乾燥品の40℃で13週間貯蔵後の安定性を実証する。

実施例11は、本発明に係る凍結乾燥品が高めのG-CSF濃度でさえ

も安定であり、そして本発明に係る配合物の高温にてさえもの長期安定性が実施例12において証明されている。

#### 実施例 1 :

##### 安定性の決定のための試験方法

凍結乾燥製剤を暗所において規定の保存温度において保存し、その後、タンパク質の純度について並びに凝集体及び二量体の発生について、逆相HPLC (RP-HPLC)、ゲルクロマトグラフィー又はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC HPLC) により調べた。更に、タンパク質含量をOD280光測定により、生物活性をバイオアッセイ (NFS60細胞試験) により、そして凝集及び沈殿を濁度測定により調べた。利用した方法を以下に説明する：

##### 1. 1 逆相HPLC

RP-HPLCはNucleosil C18カラム (Knauer Company) を用いて実施した。移動相は0.12% (v/v) のトリフルオロ酢酸 (TFA) / 水 (A) 及び0.1% (v/v) のTFA/アセトニトリル (B) より成る。クロマトグラフィーはAからBに至る直線勾配を利用し、0.5ml/minの流速で実施した。

注射量は配合に依存して3～6  $\mu$ g のG-CSFとした。これは外部標準を利用し、214nmの波長においてピーク面積を介して評価した。

##### 1. 2 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

SECクロマトグラフィーのためにはTSK G 2000SW分離カラム (7.5×300nm) を利用した。分離は室温においてイソクラチック的に、リン酸緩衝液 (22.2mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 107.7mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH6.2) 中で0.6ml/minの流速において実施した。注射量は3～6  $\mu$ g のG-CSFとした。これは外部標準を用い、214nmの検出波長においてピーク面積を介して評価した。

### 1. 3 SDS PAGE/ウェスタンブロット

3  $\mu$ g のrhG-CSFを非還元式条件下で12%のポリアクリルアミドSDSゲルに載せ、そしてゲル電気泳動にかけた。そして、分子量に応じて分離したG-CSFモノマー、二量体又は凝集体をエレクトロブロッティングによりニトロセルロースに転写させた。タンパク質バンドを特異的なポリクローナルビオチニル化抗-G-CSF抗体 (PAB<GCSF>IgG) とのインキュベーション並びにストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート (SA-APコンジュゲート)、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート (BCIP) 及びニトロブルーテトラゾリウム (NBT) を用いるホスファターゼ技術を介する検出により同定する。

モノマー、二量体及び凝集体の%量を、一式のrhG-CSF標準品の助けを借りてレーザーデンストメーター評価により決定した。

### 1. 4 NFS-60バイオアッセイ (生物活性)

G-CSF活性のインビトロ決定は、G-CSFにより刺激したNFS-60細胞の細胞培養物中の細胞数の測定を基礎とする。

適当な条件下で、細胞のデヒドロゲナーゼ活性を培地中のG-CSFの濃度と関連させることが可能である。G-CSF緩衝溶液の適度な希釈品をデヒドロゲナーゼ活性の容易に測定可能な上昇を獲得するために調製する。

その活性を570及び690nmにおいて測光的に測定した。テトラゾリウム塩MTT (黄) からホルマザン (青) に至る還元を測定した。

G-CSFのインビトロ活性は、平行線法に従い、サンプルについてのデーターを標準品についてのそれと比較することにより計算した。その評価はPh. Eur. (V III, 13) の基準に従う。

### 1. 5 散乱光測定、濁度測定

測定はガラスキューベット (直径2 cm) の中の未希釈生成物溶液に

基づいて直接行った。液体により拡散偏向する散乱光を90°の角度において測定した。DIN 38404 C2に従ってホルムジン標準懸濁物と対比させて測定し、値はTU/Fで記す。測定は適当な濁度光度計、

例えばLTP5 (Dr. Lange Company, Düsseldorf) で実施する。

### 1. 6 OD280光測定 (タンパク質含有量)

G-CSF UVスペクトルは280nmにおいて最大吸収を有し、これはトリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンの如くの側鎖原子団に基づく。測定は凝集溶液と対比させて、

—UV光度計 (例えば、Uvikon 810 P又は941, Kontron Instruments)

—セミマイクロ石英キュベット、500 $\mu$  l、経路：1 cm (例えば、Hellman, Suprasil, Cat. No. 104.002 B-QS)

により行った。

#### 実施例 2 :

0.1mg/1 mlの Poloxamer 118と50mg/mlの以下の糖又は糖アルコール、マンニトール (配合1)、ラクトース (配合2) 及びマルトース (配合物3) との水溶液を、70 $\mu$  g/mlの濃度でのG-CSFと混合した。滅菌0.2 $\mu$  m膜フィルターで濾過後、その溶液を加水分解クラス I のガラスより成る滅菌注射ボトルに充填した。凍結乾燥後、それらに滅菌窒素を吹き込み、そして前もってゆるく載せてあった栓を、その凍結乾燥品を閉じるために無菌条件下で押し込んだ。その凍結乾燥品にフランジを付け、そして暗所の中で6及び13週間、様々な温度で貯蔵した。その後、製剤の安定性を下記の方法で調べた。

表 1 a :

20°Cで貯蔵

	20°Cで6週間貯蔵			20°Cで13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
配合1 マンニトール	>99%	91%	36%	86%	47%	27%
配合2 ラクトース	>99%	>99%	18%	>99%	>99%	12%
配合3 マルトース	>99%	>99%	6%	>99%	>99%	7.8%

I RP HPLC における無変化タンパク質の純度

II SEC HPLCにおける無変化タンパク質の純度

III ウェスタンブロットにおける二量体/凝集体

表 1 b :

40℃で貯蔵

	40℃で6週間貯蔵			40℃で13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
配合 1 マンニトール	81%	70%	50%	69%	25%	70%
配合 2 ラクトース	>99%	>99%	37%	>99%	>99%	検出 できず 凝集
配合 3 マルトース	>99%	>99%	6.4%	>99%	>99%	12%

I RP HPLC における無変化タンパク質の純度

II SEC HPLC における無変化タンパク質の純度

III ウェスタンブロットにおける二量体／凝集体

## 実施例 3 :

G-CSFの凍結乾燥品を調製した。このために、以下の表に記載の助剤を注射用水に溶かし、次いでG-CSFを70  $\mu$ g/mlの濃度で加え、そして必要ならばpH値を少量の緩衝系で正確に調整した。Pluronic F68を適当な界面活性剤の代表例として使用した。その他の界面

活性剤は同様にふるまう。適当な0.2  $\mu$ mの膜フィルターで濾過することにより除菌した後、その溶液を加水分解クラス I のガラスより成る滅菌注射ボトルに充填し、そして慣用の方法に従って凍結乾燥した。凍結乾燥後、それに窒素を吹き込み、そしてその注射ボトルを無菌条件下で凍結乾燥用栓で閉じた。その製剤をフレンジ付きボトルの中で暗所において、規定の貯蔵温度で6及び12週間貯蔵し、そして実施例 1 記載の方法で調べた。

表 2 : マルトースを含む pH 3.6 の G-CSF の配合物

	配合 4	配合 5
G-CSF	70 $\mu$ g	70 $\mu$ g
マルトース	35mg	35mg
L-フェニルアラニン	10mg	10mg
アスコルビン酸	5mg	5mg
グルタチオン	10mg	10mg
L-グルタミン酸	5mg	5mg
L-アルギニン	10mg	10mg
緩衝剤 (pH)	pH 3.6まで	pH 3.6まで
Pluronic F68	—	0.1mg
注射用水	1 mlまで	1 mlまで

表 3 : 20°Cでの貯蔵

配合	貯 蔵 温 度	6 週間後 凝集体 %	12週間後 凝集体 %	6 週間後		12週間後	
				SEC % G-CSF	RP % G-CSF	SEC % G-CSF	RP % G-CSF
4	+20°C	0.0	2.6	61	63	64	69
5	+20°C	0.0	0.5	>99	>99	>99	>99

## 実施例 4 :

500  $\mu$ g/ml の G-CSF (配合物 6-10) を含む G-CSF 凍結乾燥品を以下のようにして調製した。下記の表に記載の助剤を注射用水に溶かし、G-CSF を加え、そして必要ならば pH 値を少量の塩酸又はリン酸水素二ナトリウムで調整した。各ケースにおいて、0.2  $\mu$ m の膜フィルターでの濾過により予め滅菌しておいた 1 ml の溶液を加水分解クラス I のガラスより成る注射ボトルに充填し、そして慣用の方法に従って凍結乾燥した。凍結乾燥後、それらに窒素を吹き込み、そして凍結乾燥品を無菌条件下で凍結乾燥用栓で閉じた。フレンジ付きの凍結乾燥品を暗所の中で規定の温度において貯蔵し、そして実施例 1 記載の方法を利用して調べた。



表 4 : 配合物 6 ~ 10 の組成

	配合 6	配合 7	配合 8	配合 9	配合 10
G-CSF	0.5 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g
マルトース	35mg	35mg	35mg	—	—
L-フェニルアラニン	10mg	10mg	10mg	10mg	10mg
アスコルビン酸	5mg	—	—	5mg	—
グルタチオン	10mg	—	—	10mg	—
L-グルタミン酸	5mg	—	—	5mg	—
L-アルギニン	10mg	10mg	10mg	10mg	10mg
緩衝剤 (pH)	4.5まで	4.5まで	6.5まで	4.5まで	6.5まで
Pluronic F68	0.1mg	0.1mg	0.1mg	0.1mg	0.1mg
注射用水	1mlまで	1mlまで	1mlまで	1mlまで	1mlまで

表 5 : 分析結果

配合	貯 蔵 温 度	ウェスタンブロット		6 週 間 後		12 週 間 後	
		6 w % 凝集体	12 w % 凝集体	SEC % G-CSF	RP % G-CSF	SEC % G-CSF	RP % G-CSF
6	+8°C	<1	1.0	>99%	0.9	>99%	0.7
	+40°C	<1	1.7	>99%	0.6	>99%	0.6
7	+8°C	<1	1.1	>99%	1.6	>99%	1.1
	+40°C	<1	2.3	>99%	1.9	>99%	1.1
8	+8°C	<1	—			>98%	1.5
	+40°C	<1	—			>98%	1.4
9	+8°C	3.8	0.3	95%	5.8	95%	1.5
	+40°C	7.9	2.5	95%	6.4	86%	0.8
10	+8°C	—	5.2			96%	1.0
	+40°C	—	10.3			89%	2.6

## 実施例 5 :

以下の表に記載の配合物（配合11-14）を以下のようにして調製した。助剤を注射用水に溶かし、次いでG-CSFを記載の濃度で加えた。必要ならば、pH値をリン酸緩衝剤の成分の助けを借りて正確に調整した。その溶液を0.2 $\mu$ mの孔サイズの滅菌膜フィルターで濾過し、そして無菌条件下で加水分解クラスIの注射ボ

トルに充填し、そして凍結乾燥した。凍結乾燥後、それらに窒素を吹き込み、その凍結乾燥品を無菌条件下で凍結乾燥用ゴム栓で閉じ、フランジを付けた。その凍結乾燥品を暗所の中で規定の貯蔵温度において貯蔵した。6及び13週間後、それらを実施例1記載の方法で調べた。

表 6 : アミノ糖を含む凍結乾燥製剤

	配合 11	配合 12	配合 13	配合 14
G-CSF	0.5 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g	0.5 $\mu$ g
Pluronic F68	0.1mg	0.1mg	0.1mg	0.1mg
メチル-グルコサミン	—	10mg	—	10mg
ガラクトサミン	10mg	—	10mg	—
グリシン	—	—	35mg	35mg
マルトース	35mg	35mg	—	—
フェニルアラニン	10mg	—	—	—
リン酸緩衝剤	pH 7.0 まで	pH 7.0 まで	pH 7.0 まで	pH 7.0 まで
注射用水	1.0ml まで	1.0ml まで	1.0ml まで	1.0ml まで

上記の製剤の貯蔵後に得られた分析データを下記の結果の表にまとめた。

表 7 : 分析結果

DCP = 分解生成物

配合	貯 蔵	6 週間 ウェスタン ブロット % 凝集体	12週間 ウェスタン ブロット % 凝集体	12週間	
				RP-HPLC % G-CSF	% DCP SEC HPLC
11	+ 8°C	3.8	2.9	>99	1.2
	+ 40°C	3.2	2.3	>99	1.8
12	+ 8°C	1.8	3.8	>99	1.4
	+ 40°C	1.7	4.5	>99	0.7
13	+ 8°C	1.1	1.4	>99	0.9
	+ 40°C	16.8	13.0	75	4.2
14	+ 8°C	1.6	12.4	97.5	1.2
	+ 40°C	7.7	26.3	84.5	3.5

## 実施例 6 :

以下に記載の配合物15及び16は以下のようにして調製した：記載の助剤を注射用水に溶かし、G-CSFを記載の濃度において加えた。そのpHを必要ならば緩衝成分の一部を用いて調整した。その後、その溶液を0.2 $\mu$ mの孔サイズを有する滅菌膜フィルターで濾過し、そして無菌条件下で加水分解クラス I のガラスより成る滅菌注射ボトルの中に分注した。その後、その注射製剤を凍結乾燥し、次いで窒素を吹き込み、そして注射ボトルを無菌条件下で凍結乾燥用栓で閉じ、次いでフランチを付けた。その配合物を暗所において規定の

温度で貯蔵し、そして以下のパラメーターについて調べた。実施例 1 記載の試験法をこの目的のために利用した。

## 配合 15

## 配合 16

G-CSF	0.25	G-CSF	0.3mg
ポリソルベート80	0.05mg	ポリソルベート80	0.1mg
フェニルアラニン	5mg	マンニトール	50mg
マルトース	17.5mg	緩衝剤	pH4.5 まで
L-アルギニン	5mg	注射用水	1.0ml まで
緩衝剤	pH 4.5まで		
注射用水	0.5mlまで		

表 8 : 3 及び 6 ヶ月間にわたる配合物15及び16の貯蔵後の試験結果

	配 合 15				配 合 16			
	貯蔵期間 3ヶ月 4-8℃ 23℃		貯蔵期間 6ヶ月 4-8℃ 23℃		貯蔵期間 3ヶ月 4-8℃ 23℃		貯蔵期間 6ヶ月 4-8℃ 23℃	
ウェスタンブロット (二量体)	2.2	<1%	1.3%	0.7	<1%	12%	4.1%	17
SBC-HPLC (二量体)	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	2%	<1%	3
RP-HPLC (G-CSFピーク)	>99%	>99%	>98%	>98%	>99%	98.2%	>98%	>98

## 実施例 7 :

表 9 記載の配合物は以下のようにして調製した :

記載の助剤を注射用水に溶かし、G-CSFを記載の濃度において加え、その後pHを必要ならば少量の緩衝成分で調整した。その薬理溶

液を0.2 $\mu$ mの孔サイズを有する滅菌膜フィルターで濾過し、その後加水分解クラス I のガラスより成る滅菌注射ボトルの中に無菌条件下で分注し、そして凍結乾燥した。

凍結乾燥後、それらに窒素を吹き込み、そしてそのボトルを無菌条件下で凍結乾燥用栓で閉じた。これらのボトルにフレンジを付け、そして暗所の中で規定の温度条件下で貯蔵した。関連の貯蔵期間後、分析調査を実施例1記載の方法を利用して行った(表10参照)。

表9: 他のビルダーと対比させてのマニトールを含む G-CSF凍結乾燥品

	配合 17	配合 18	配合 19	配合 20	配合 21	配合 22	配合 23	配合 24
G-CSF	350 $\mu$ g	350 $\mu$ g	175 $\mu$ g	175 $\mu$ g	175 $\mu$ g	175 $\mu$ g	175 $\mu$ g	175 $\mu$ g
マルトース			17.5mg	17.5mg	17.5mg	—	—	—
グリシン						4mg	10mg	8.9mg
アルギニン			5mg	—	5mg	5mg	—	
フェニルアラニン			5mg	5mg	5mg	5mg	—	2.5mg
マンニトール	50mg	50mg				—	—	
Tween 80	0.1mg	0.1mg	0.05mg	0.05mg	0.05mg	0.05mg	0.05mg	0.05mg
pH	4.5	7.2	4.5	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
(緩衝剤)	HCl	リン酸塩	HCl	HCl	HCl	HCl	リン酸塩	リン酸塩
注射用水	1.0ml まで	1.0ml まで	0.5ml まで	0.5ml まで	0.5ml まで	0.5ml まで	0.5ml まで	0.5ml まで

表10において、記載の配合物について分析データをまとめる：

配合	貯 蔵	4 週 間		4 週 間 ウェスタンブロット
		RP-HPLC % G-CSF	SEC-HPLC % G-CSF	
17	8℃	>99	>99	3.6 % 二量体
	30℃	94	92	9.6 % 二量体
	40℃			14.4 % 二量体
18	8℃	69	60	凝集体
	30℃	44	36	凝集体
	40℃	13	12	凝集体
19	8℃	>99	>99	1.0 % 二量体
	30℃	>99	95.5	0.5 % 二量体
	40℃	>99	97.5	0.5 % 二量体
20	8℃	>99	>99	1.6 % 二量体
	30℃	>99	>99	1.4 % 二量体
	40℃	>99	>99	2.3 % 二量体
21	8℃	>99	>99	1.5 % 二量体
	30℃	>99	97.5	2.1 % 二量体
	40℃	>99	97	2.0 % 二量体
22	8℃	>99	>99	2.8 % 二量体 / 凝集体
	30℃	96	96	3.0 % 二量体 / 凝集体
	40℃			12 % 二量体 / 凝集体
23	8℃	>99	>99	6.8 % 二量体
	30℃	91.5	92	凝集体
	40℃	79	74	凝集体
24	8℃	>99	>99	10.8 % 二量体
	30℃	88	85	凝集体
	40℃	67	60	凝集体

#### 実施例 8 :

7.4のpHを有する本発明に係る再溶解凍結乾燥品の放置時間以下の組成物を調製した :



mg/ml	配合 25
G-CSF	0.35
ポリソルベート 80	0.1
マルトース	50
アルギニン	10
フェニルアラニン	10
塩 酸	pH 7.4まで

記載の助剤を1mlの注射用水に溶かし、G-CSFを加え、そしてpH値をpH 7.4に調整した。この溶液を0.2 $\mu$ mの孔サイズを有する滅菌膜フィルターでの濾過により除菌し、その後加水分解クラスIの注射ボトルに分注した。

適当な凍結乾燥用栓を載せた後、その製剤を-25℃のメイン乾燥温度、その後の残留水分が<5%に至るまでの+8℃の乾燥温度において凍結乾燥した。その乾燥した凍結乾燥品に窒素を吹き込み、そして閉じた。

4～8℃で6ヶ月後、その凍結乾燥品を1mlの注射用水に溶かし、そして室温で24時間放置した。

この放置時間後、溶解直後に試験したサンプルに比して、生物活性（NFS-60試験）、タンパク質含有量（測光 OD280）並びに純度（ウェスタンブロット）、純度（SEC HPLC）、純度（SDS PAGE）及び純度（RP HPLC）について、実施例1記載の検査方法を用いて変化は認められなかった。

濁度測定は、機械的ストレス下でさえも、非常に低い濁度値をもたらした。

このことは、マルトース及びアルギニン緩衝剤を含むpH 7.4の本

発明に係る配合物の再溶解凍結乾燥品が臨床用途にとって適切な放置時間を有することを明確に示唆する。

#### 実施例 9 :

40℃で13週間の貯蔵を経た、マルトース、ラフィノース、スクロース又はトレハロースを含む本発明に係る凍結乾燥品の安定性

50mg/mlのマルトース又は同重量の a) ラフィノースもしくは b) スクロース

もしくはc) トレハロースを含む実施例8、配合物25に該当する3つの凍結乾燥品を調製した。

全ての凍結乾燥品を5℃、25℃、30℃及び40℃の温度で13週間貯蔵し、その後、それらを溶解し、そして目視的に、並びに実施例1記載の試験法SEC HPLC, RP HPLC、ウェスタンブロット及びSDS pageを利用して調べた。

全てのケースにおいて、無色透明な溶液が得られた。SEC HPLCにおいては、生成物ピークは>98%のサイズを有し、そして二量体／凝集体は<1%のサイズを有していた。RP HPLCにおいては、生成物ピークは100%に達し、第二ピークは検出できず、メインピークはワーキング標準品に相当した。SDS-pageにおいては、分解生成物、二量体又は凝集体は検出できなかった。

表：13週間の貯蔵期間後

温度	SEC HPLC % G-CSF	RP HPLC % G-CSF	ウェスタン ブロット % 凝集体	SDS-Page % マイナーバンド
5℃	>98%	100%	n. d.	<1
20℃	>98%	100%	n. d.	<1
30℃	>98%	100%	n. d.	<1
40℃	>98%	100%	n. d.	<1

#### 実施例10:

30℃で13週間貯蔵後のpH 4.5及びpH 7.2のリン酸アルギニン及び塩化アルギニン緩衝剤を含む本発明に係るマルトース凍結乾燥品の安定性

緩衝剤及びpH値のみが異なる、実施例8記載の製造方法に従って以下の配合物を調製した：

	配合 26	配合 27	配合 28	配合 29
G-CSF	0.35mg	0.35mg	0.35mg	0.35mg
ポリソルベート80	0.1mg	0.1mg	0.1mg	0.1mg
フェニルアラニン	10mg	10mg	10mg	10mg
アルギニン	10mg	10mg	10mg	10mg
マルトース	47.5mg	47.5mg	47.5mg	47.5mg
リン酸	pH 4.5 まで	pH 7.2 まで		
塩 酸			pH 4.5 まで	pH 7.2 まで

これらの製剤を4～8℃、20～25℃及び30℃の温度で貯蔵し、13週間後に1mlの注射用水の中で溶解し、そして実施例1記載の試験法を用い、即ち、RP HPLC、SEC HPLC（純度）、及びウェスタンブロット（分解、二量化及び凝集体の生成）を調べた。その結果を表11に示し、そして本発明に係るpH 4.5及び7.2の凍結乾燥品は30℃で13週間の貯蔵を経て安定であることが示された。

表11： 30℃で13週間後の結果

	RP-HPLC % マイナーピーク	SEC-HPLC	ウェスタンブロット 分解物 二量体 凝集体		
配合 26	< 1	< 1	n. d.	n. d.	n. d.
配合 27	< 1	< 1	n. d.	n. d.	n. d.
配合 28	< 1	< 1	n. d.	< 1%	n. d.
配合 29	< 1	< 1	n. d.	< 1%	n. d.

n. d. = 検出できず

#### 実施例11：

4℃で4及び13週間の貯蔵後のpH 7.4のリン酸アルギニン及び塩化アルギニン緩衝剤を含む本発明に係るマルトース凍結乾燥品の安定性

配合物を実施例8記載のようにして調製し、そしてそのpH値をpH7.4に、一の

ケースでは塩酸により、そして他のケースにおいてはリン酸により調整した。

	配合 30	配合 31
G-CSF	0.35mg	0.35mg
ポリソルベート 80	0.1mg	0.1mg
フェニルアラニン	10mg	10mg
アルギニン	10mg	10mg
マルトース	47.5mg	47.5mg
リン酸	pH 7.4	
塩 酸		pH 7.4

これらの二つの製剤を4～8℃及び40℃の温度で4及び13週間貯

蔵した。13週間の貯蔵後の検査結果（ウェスタンブロット、SDS page）を以下の表12に示す。4週間の貯蔵後の結果は同じである。

その結果は、本発明に係るpH 7.4のマルトース凍結乾燥品が40℃で13週間の貯蔵を経て安定であることを示す。

表12： 40℃で13週間後の結果

	貯蔵 温度	ウェスタンブロット、非還元		SDS-Page, 還元			残留 水分 %
		凝集体 <1%	二量体 <2%	生成物 バンド	分解 生成物	他の バンド	
配合 30	5℃	n. d.	n. d.	<98%	<1%	n. d.	1.4
	40℃	n. d.	n. d.	<98%	<1%	n. d.	2.0
配合 31	5℃	n. d.	n. d.	<98%	<1%	n. d.	1.9
	40℃	n. d.	n. d.	<98%	<1%	n. d.	2.1

#### 実施例12:

40℃で13週間貯蔵後のpH 7.4並びに0.5及び1.0mg/mlのG-CSF濃度を有する本発明に係る凍結乾燥品の安定性

G-CSFの含有量が異なる以下の配合物を実施例8に記載の製造方法に従って調製した：

mg/ml	配合 32	配合 33
G-CSF	0.5mg	1.0mg
ポリソルベート 80	0.1mg	0.1mg
フェニルアラニン	10mg	10mg
アルギニン	10mg	10mg
マルトース	47.5mg	47.5mg
リン酸	pH 7.4	pH 7.4

これらの配合物を $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ 、 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 及び $40^{\circ}\text{C}$ で4週間及び13週間貯蔵し、その後1mlの注射用水に溶かし、そして実施例1記載の試験法SEC HPLC、RP HPLC、ウェスタンブロット及びSDS-pageを用いて調べた（試験結果は表13を参照のこと）。

これらの結果は、 $40^{\circ}\text{C}$ で13週間の貯蔵後、 $1\text{mg/ml}$ に至るまで高いタンパク質濃度でさえも、本発明に係る配合物の凍結乾燥品は安定であることを示す。

#### 実施例14:

##### 9ヶ月の長期安定性

実施例11の配合物31を用いて凍結乾燥品を調製し、そしてその製剤を9ヶ月間、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $5^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 及び $40^{\circ}\text{C}$ の温度で貯蔵し、そして実施例1記載の全ての試験法を利用して3、6及び9ヶ月後に試験した。

貯蔵期間中に調べたどのパラメーターにおいても変化は認められなかった。貯蔵期間の終了時、全ての温度においてこの製剤は完全に生物活性であることが証明され、それは完全なタンパク質含有量を有し、そして全ての純度の決定においてインタクトG-CSF分子の1%をはるかに下まわるバンド又はピークを示した。

本発明に係る凍結乾燥品は高温で長期貯蔵したときでさえも安定であり、それ故従来技術の安定性をはるかに超える。

表14: 30℃で貯蔵

	3 ヶ月	6 ヶ月	9 ヶ月
NFS 60 試験 80-125%	該当	該当	該当
OD 280	358mg	360mg	352mg
SDS page マイナーバンド	<1%	<1%	<1%
ウェスタンブロット % 凝集体 % 二量体	n. d. <1%	n. d. <1%	n. d. <1%

	3 ヶ月	6 ヶ月	9 ヶ月
RP HPLC 生成物ピーク	>99%	>99%	>99%
SEC HPLC 生成物ピーク マイナーピーク	>98% n. d.	>98% n. d.	>98% n. d.
濁度測定 TU/F	0.5	0.5	0.5

表13:

## 配合 32

試験パラメーター	0週間 (冷蔵)	13週間 (-20℃)	13週間 (冷蔵)	13週間 (RT)	13週間 (30℃)	13週間 (40℃)
目視検査 外觀、凍結乾燥品 清澄度 (溶液)	—	白色 透明	白色 透明	白色 透明	白色 透明	白色 透明
SEC-HPLC (純度 %) (二量体/凝集体 %)	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1
RP-HPLC (純度 %) (マイナーピークの合計 %)	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1
ウェスタンブロット (二量体 %) (凝集体 %) (分解生成物 %)	n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d.	n.d. n.d. n.d.
SDS-PAGE、銀染色 (モノマー %) (追加バンド %) (分解生成物 %)	— — —	>>99% n.d. <<1%	>>99% n.d. <<1%	>>99% n.d. <<1%	>>99% n.d. <<1%	>>99% n.d. <<1%

配合 33

試験パラメーター	0週間 (冷蔵)	13週間 (-20℃)	13週間 (冷蔵)	13週間 (RT)	13週間 (30℃)	13週間 (40℃)
目視検査 外観、凍結乾燥品 滑澄度 (溶液)	—	白色 透明	白色 透明	白色 透明	白色 透明	白色 透明
SEC-HPLC {純度 %} {二量体/凝集体 %}	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1
RP-HPLC {純度 %} {マイナーピークの合計 %}	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1	>98 <1
ウェスタンブロット {二量体 %} {凝集体 %} {分解生成物 %}	n. d. n. d. n. d.	n. d. n. d. n. d.	n. d. n. d. n. d.	n. d. n. d. n. d.	n. d. n. d. n. d.	n. d. n. d. n. d.
SDS-PAGE、銀染色 {モノマー %} {追加バンド %} {分解生成物 %}	— — —	>>99% n. d. <<1%	>>99% n. d. <<1%	>>99% n. d. <<1%	>>99% n. d. <<1%	>>99% n. d. <<1%

n. d. = 検出できず



【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年11月22日

【補正内容】

請求の範囲

1. 貯蔵安定であるG-CSFの凍結乾燥薬理製剤の製造のための方法であって、G-CSFと任意的に更なる薬理助剤との水性調製品を調製し、次いでその溶液を凍結乾燥するが、ここで添加剤であるマルトース、セロビオース、ゲンチオビオース、イソマルトース、ラフィノース、トレハロース又はアミノ糖を、凍結の際の、又は高温での貯蔵の際のG-CSFの品質の低下を避けるために、その水性溶液の製造において利用している、方法。

2. 前記凍結乾燥製剤の再溶解後のG-CSFの凝集体及び二量体の発生が実質的に回避されている、請求項1記載の方法。

3. 添加剤としてマルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖を使用する、請求項1又は2記載の方法。

4. 添加剤としてマルトース、ラフィノース、グルコサミン、ガラクトサミン又はノイラミニン酸を使用する、請求項3記載の方法。

5. 使用するG-CSFタンパク質の量より少ない又は最大でそれと同量である生理学的に寛容される量の界面活性剤を加える、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

6. 0.5mg/ml、好ましくは0.01～0.1mg/mlの量で界面活性剤を加える、請求項5記載の方法。

7. 生理学的に寛容される量のアミノ酸を加える、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

8. アルギニン及び／又はフェニルアラニンを加える、請求項7記載の方法。

9. 酸化防止剤、錯生成剤、緩衝剤、酸、塩基又は等張性剤を生理学的に寛容される助剤として加える、請求項1～8のいずれか1

項記載の方法。

10. リン酸緩衝剤又は酢酸緩衝剤を生理学的に寛容される助剤として加える、

請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

11. リン酸アルギニン緩衝剤、塩化アルギニン緩衝剤又はクエン酸アルギニン緩衝剤を好ましくは7～8のpHにおいて、生理学的に寛容される助剤として加える、請求項1～10のいずれか1項記載の方法。

12. G-CSFを含む薬理製剤の凍結の際の、又は高温での貯蔵の際のG-CSF品質の低下を避けるためのマルトース、セロビオース、ゲンチビオース、イソマルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース、グルコサミン、ガラクトサミン又はノイラミニン酸の利用。

13. マルトース、セロビオース、ゲンチビオース、イソマルトース、ラフィノース、グルコサミン、ガラクトサミン又はノイラミニン酸を含むG-CSFの凍結乾燥薬理製剤。

14. マルトース、セロビオース、ゲンチビオース又はイソマルトースを含む、請求項13記載のG-CSFの凍結乾燥薬理製剤。

15. 請求項13又は14記載の凍結乾燥製剤の再溶解により得られるG-CSFの水性薬理製剤。

16. 前記溶液が6.5～8又は3～5のpH値、好ましくは7.0～7.5のpH値を有する、請求項15記載の水性薬理製剤。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 93/03543

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 5	A61K37/02	A61K9/14 A61K47/18 A61K47/26
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 5 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE,A,37 23 781 (CHUGAI SEIYAKU K.K.) 21 January 1988 cited in the application see claims 1-5,10-13 see page 4, line 30 - line 54 see page 4, line 57 - line 65 see page 5, line 16 - line 19 see page 5, line 31 - line 33 see examples	1-7,12,13
Y	EP,A,0 373 679 (AMGEN INC.) 20 June 1990 cited in the application see claims see page 4, line 23 see page 4, line 35 - line 43	1-13
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 March 1994		09.03.94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 3818 Patentlaan 2 NL - 2180 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tr. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Scarponi, U

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Patent Application No  
 PCT/EP 93/03543

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	EP,A,0 528 314 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 February 1993 cited in the application see claims 1,3,5,11,13 see page 4, line 25 - line 33 see page 4, line 43 - line 51 see page 5, line 12 - line 17 see page 5, line 40 - line 44 ---	1-13
P,Y	EP,A,0 528 313 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 February 1993 cited in the application see claims 1,8,10,13 see page 5, line 45 - line 47 see page 5, line 51 - line 53 see page 6, line 40 - line 45 see page 6, line 54 - line 57 see page 8, line 1 - line 2 ---	1-13
P,X	WO,A,93 13752 (SRI INTERNATIONAL) 22 July 1993 see claims 11-14 see page 3, line 19 see page 4, line 9 - line 12 see example 3 -----	1,2,4, 12,13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 93/03543

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-3723781	21-01-88	AU-B- 611856	27-06-91
		AU-A- 7566587	21-01-88
		BE-A- 1000253	27-09-88
		CH-A- 671157	15-08-89
		FR-A- 2601591	22-01-88
		GB-A, B 2193631	17-02-88
		JP-A- 63146826	18-06-88
		NL-A- 8701640	16-02-88
		SE-A- 8702907	19-01-88
		JP-A- 63146827	18-06-88
		JP-A- 63152326	24-06-88
		JP-A- 63146828	18-06-88
EP-A-0373679	20-06-90	US-A- 5104651	14-04-92
		AU-B- 621695	19-03-92
		AU-A- 4668989	10-07-90
		CA-A- 2005143	16-06-90
		JP-T- 3502808	27-06-91
		WO-A- 9006762	28-06-90
EP-A-0528314	24-02-93	DE-A- 4126984	18-02-93
		AU-A- 2405292	16-03-93
		WO-A- 9303745	04-03-93
EP-A-0528313	24-02-93	DE-A- 4126983	18-02-93
		AU-A- 2409492	16-03-93
		WO-A- 9303744	04-03-93
WO-A-9313752	22-07-93	NONE	

## フロントページの続き

- (72)発明者 ピンター, ゲルハルト  
ドイツ連邦共和国, デー—69221 ドッセ  
ンハイム, ヤーンシュトラーセ 20 エー
- (72)発明者 ボーグ, ハインリッヒ  
ドイツ連邦共和国, デー—69514 ローデ  
ンバッハ, リンデンシュトラーセ 6